学校编码：10384　　分类号_____密级_____
学　　号：20620100153626　　UDC_____

厦门大学

博 士 学 位 论 文

雨生红球藻的光保护机制及脂肪酸与虾青素合成的相互关系

Photoprotection Mechanisms and Crosstalk between the Biosynthesis of Fatty Acids and Astaxanthin in *Haematococcus Pluvialis*

王宝贝

指导教师姓名：卢 英 华　教　授
胡　强　教　授
专 业 名 称：工　业　催　化
论文提交日期：2014 年 5 月
论文答辩日期：2014 年 5 月
学位授予日期：2014 年　月

答辩委员会主席：_____

评　阅　人：_____

2014 年 5 月

（此页空白）

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外，该学位论文为(　　)课题(组)的研究成果，获得(　　)课题(组)经费或实验室的资助，在(　　)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名)：

年　　月　　日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

(　　) 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于　　年　　月　　日解密，解密后适用上述授权。

(　　) 2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年　　月　　日

目　录

缩略词 I

摘　要 V

第一章 文献综述 1

1.1 虾青素简介 1

1.1.1 虾青素功能及应用 1

1.1.2 天然虾青素的生产方法 2

1.2 雨生红球藻简介 2

1.2.1 雨生红球藻的细胞形态与繁殖 2

1.2.2 雨生红球藻的培养 4

1.2.3 雨生红球藻积累虾青素的条件 5

1.3 雨生红球藻中虾青素的合成与基因调控 7

1.3.1 雨生红球藻中虾青素的生物合成 7

1.3.2 虾青素合成关键酶的研究 9

1.3.3 胁迫条件下虾青素相关基因表达水平的研究 11

1.3.4 虾青素与活性氧 12

1.3.5 虾青素合成路径与光合作用电子传递链的关系 12

1.4 植物光保护机制 13

1.4.1 减少光能的吸收 14

1.4.2 光合系统的状态转移 14

1.4.3 非光化学淬灭(NPQ) 14

1.4.4 环式电子传递 16

1.4.5 植物体内活性氧的消除体系 16

1.4.6 光呼吸作用 17

1.4.7 各种光保护机制的互补效应 17

1.5 微藻中的脂类 18

1.5.1 酰基脂的结构与功能 18

1.5.2 微藻中的酰基脂 20
1.5.3 微藻中的脂肪酸 21
1.5.3.1 甘油酯的脂肪酸组成 22
1.5.3.2 甘油酯和脂肪酸组成的影响因素 22
1.6 微藻中脂肪酸及甘油酯的合成路径 23
1.6.1 脂肪酸的从头合成 23
1.6.2 叶绿体甘油酯的合成 25
1.6.2.1 原核途径合成甘油酯 25
1.6.2.2 真核途径合成甘油酯 26
1.6.2.3 甘油三酯的合成 28
1.7 脂质组的检测方法 29
1.7.1 薄层色谱分析脂质(TLC) 30
1.7.2 气相色谱质谱联用(GC-MS) 30
1.7.3 液相色谱质谱联用(LC-MS) 31
1.8 虾青素合成与脂肪酸合成的相互关系 33
1.9 雨生红球藻的大规模培养及产品生产 34
1.10 本论文的研究内容和意义 35
第二章 微藻甘油酯鉴定分析方法的建立 37
2.1 引言 37
2.2 材料与方法 38
2.2.1 藻种 38
2.2.2 主要实验试剂及仪器 38
2.2.3 微藻培养 38
2.2.4 微藻油脂样品的提取 39
2.2.5 液相色谱分离条件 39
2.2.6 电喷雾质谱条件 40
2.3 结果与分析 41
2.3.1 甘油酯类别及脂肪酸侧链的鉴定分析 41
2.3.1.1 磷脂及甜菜酯种类及酰基位置的确定 42
2.3.1.2 糖脂的种类及酰基位置的确定 47

2.3.1.3 甘油三酯的检测及其酰基位置的确定 50
2.3.2 甘油酯的定量分析 51
2.3.2.1 甘油膜脂的绝对定量 51
2.3.2.2 甘油三酯的定量分析 53
2.3.3 雨生红球藻油脂样品的分析 54
2.3.3.1 雨生红球藻中甘油膜脂种类及含量 54
2.3.3.2 雨生红球藻中甘油三酯种类及含量 55
第三章 雨生红球藻成熟过程中光保护机制的变化 56
3.1 引言 56
3.2 材料与方法 57
3.2.1 藻种 57
3.2.2 主要实验试剂及仪器 57
3.2.3 微藻培养 57
3.2.3.1 培养基 57
3.2.3.2 藻种保藏 57
3.2.3.3 藻种培养 58
3.2.3.4 藻液培养 58
3.2.4 实验分析方法 59
3.2.4.1 藻细胞数的测定 59
3.2.4.2 色素提取 59
3.2.4.3 类胡萝卜素及叶绿素的测定 59
3.2.4.4 总脂肪酸的提取及测定 61
3.2.4.5 叶绿素荧光检测 61
3.2.4.6 蛋白免疫印迹分析 62
3.2.4.7 细胞总蛋白的检测 63
3.2.4.8 细胞总糖检测 64
3.2.4.9 甘油酯的检测和分析 65
3.3 结果与分析 65
3.3.1 雨生红球藻成熟过程中细胞形态的变化 65
3.3.2 细胞色素变化趋势 67

3.3.3 在高光适应和细胞成熟过程中细胞光合作用能力的变化 68
3.3.4 细胞成熟过程及高光诱导对细胞生化组成的影响 71
3.3.5 甘油酯的定量分析 73
3.3.6 甘油膜脂的特征及其在细胞成熟和高光适应过程中的重新分布 75
3.3.7 甘油三酯种类的变化趋势 77
3.4 讨论 80
3.4.1 雨生红球藻在细胞成熟过程中形成了多个防御机理 80
3.4.2 甘油酯在雨生红球藻中的合成 83
3.4.3 高光胁迫下叶绿体膜脂的变化和重组 85
3.4.4 采用成熟静止细胞生产虾青素的技术开发 87
第四章 雨生红球藻中脂肪酸与虾青素合成的相互关系 88
4.1 引言 88
4.2 材料与方法 89
4.2.1 藻种 89
4.2.2 主要实验试剂及仪器 89
4.2.3 微藻培养 89
4.2.3.1 培养基 89
4.2.3.2 藻种保藏和培养 89
4.2.3.3 藻液培养 89
4.2.4 实验分析方法 89
4.2.4.1 藻细胞数的测定 89
4.2.4.2 微藻干重的测定 90
4.2.4.3 色素提取及检测 90
4.2.4.4 总脂肪酸的提取及测定 90
4.2.4.5 总 RNA 提取，cDNA 生成及 RT-PCR 定量 90
4.2.4.6 粗酶的提取及亚细胞器的分离 90
4.2.4.6 虾青素体外合成体系 91
4.2.4.7 蛋白免疫印迹 92
4.3 结果与分析 92
4.3.1 雨生红球藻在不同条件下的生长及虾青素、脂肪酸的积累 92

4.3.1.1 细胞生长 92
4.3.1.2 虾青素及总脂肪酸在雨生红球藻中的积累 93
4.3.2 雨生红球藻中脂肪酸与虾青素合成相互关系的确认 94
4.3.3 转录水平研究脂肪酸与虾青素合成的相互关系 96
4.3.3.1 虾青素合成关键基因在不同条件下的表达水平 96
4.3.3.2 脂肪酸合成关键基因在不同条件下的表达水平 96
4.3.4 酶学水平研究雨生红球藻中脂肪酸与虾青素合成的相互关系 98
4.3.4.1 外源脂肪酸添加体系的建立 98
4.3.4.2 添加不同外源脂肪酸对雨生红球藻积累虾青素的影响 100
4.3.5 酯化过程对雨生红球藻体外合成虾青素的影响 102
4.3.5.1 体外合成虾青素酶反应体系的建立 102
4.3.5.2 脂肪酸对体外合成虾青素的影响 106
4.3.5 虾青素在藻细胞中的合成部位 108
4.3.6 催化虾青素酯化反应的酶 110
4.4 讨论 112
4.4.1 虾青素酯化是雨生红球藻积累大量虾青素的必要条件 112
4.4.2 内质网是游离虾青素和虾青素酯合成的场所 113
4.4.3 DGATs 可能参与催化虾青素酯化反应 115
第五章 结论与展望 116
5.1 结论 116
5.2 存在问题与展望 118
参考文献 119
附　录 136
在读期间发表论文 144
致　谢 145

Contents

List of abbreviations ..... **I**

Abstract ..... **V**

Chapter 1 General introduction **1**

1.1 Introduction of astaxanthin **1**

1.1.1 Functions and applications of astaxanthin 1

1.1.2 Natural sources of astaxanthin 2

1.2 Introduction of *Haematococcus pluvialis* **2**

1.2.1 Cell morphology and multiplication 2

1.2.2 Cultivation for *H. pluvialis* 4

1.2.3 Conditions for astaxanthin accumulated in *H. pluvialis* 5

1.3 Biosynthesis of astaxanthin in *H. pluvialis* and related genes **7**

1.3.1 Biosynthesis of astaxanthin in *H. pluvialis* 7

1.3.2 Expression level of genes related to astaxanthin biosynthesis under stress conditions 9

1.3.3 Key enzymes for astaxanthin biosynthesis 11

1.3.4 Relationship between astaxanthin and ROS 12

1.3.5 Relationship between astaxanthin biosynthesis and electron transport in photosynthesis 12

1.4 Photoprotection mechanism in plant **13**

1.4.1 Decrease in accimilation of light 14

1.4.2 Photosynthetic state transitions 14

1.4.3 Nonphotochemical quenching (NPQ) 14

1.4.4 Cyclic electron transport 16

1.4.5 ROS Quenching in plant 16

1.4.6 Photorespiration 17

1.4.7 Complementation between different photoprotective mechanisms 17

1.5 Lipids in algae **18**

1.5.1 Structure and functions in acyl lipids 18

1.5.2 Acyl lipids compositions in algae 20

1.5.3 Fatty acids in algae 21

1.5.3.1 Fatty acids compositions in glycerolipids 22
1.5.3.2 Effect factor of compositions glycerolipids and fatty acids 22
1.6 Biosynthesis of fatty acids and glycerolipids in algae 23
1.6.1 De novo synthesis of fatty acids 23
1.6.2 Glycerolipids compositions in chloroplast 25
1.6.2.1 Prokaryotic biosynthesis pathway for glycerolipids 25
1.6.2.2 Eukaryotic biosynthesis pathway for glycerolipids 26
1.6.2.3 Biosynthesis of TAG 28
1.7 Analytical method for lipidomics 29
1.7.1 Thin Layer Chromatography (TLC) 30
1.7.2 Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) 30
1.7.3 Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) 31
1.8 Relationship between astaxanthin biosynthesis and fatty acids biosynthesis 33
1.9 Large-scale production of *H. pluvialis* 34
1.10 The research contents, meaning and significance of this dissertation 35
Chapter 2 Development of a lipidomics platform for analysis of algae glycerolipids 37
2.1 Introduction 37
2.2 Material and methods 38
2.2.1 Algae strain 38
2.2.2 Main reagents and instruments 38
2.2.3 Algae culture 38
2.2.4 Lipids extractions from algae 39
2.2.5 Separation conditions for HPLC 39
2.2.6 Analysis conditions for ESI-MS 40
2.3 Result and analysis 41
2.3.1 Identification of glycerolipid classes and their acyl compositions 41
2.3.1.1 Identification of class and acyl composition from glycerophospholipids and DGTS 42
2.3.1.2 Identification of class and acyl composition from galactolipids 47
2.3.1.3 Identification of class and acyl composition from triacylglycerol. 50
2.3.2 Quantitative analysis of glycerolipids 51

2.3.2.1 Calibration curves for membrane glycerolipids 51
2.3.2.2 Calibration curves for triacylglycerolipid 53
2.3.3 Identification of glycerolipids from *H. pluvialis* lipid extract 53
2.3.3.1 Identification and quantification of membrane glycerolipids from *H. pluvialis* 54
2.3.3.2 Identification and quantification of TAG from *H. pluvialis* 55
Chapter 3 Photoprotection mechanism during encystment of *H. pluvialis* 56
3.1 Introduction 56
3.2 Material and methods 57
3.2.1 Algae strain 57
3.2.2 Main reagents and instruments 57
3.2.3 Algae culture 57
3.2.3.1 Media 57
3.2.3.2 Strain preservation 57
3.2.3.3 Algae preculture 58
3.2.3.4 Algae culture 58
3.2.4 **Analytical methods** 59
3.2.4.1 Determination of cell number 59
3.2.4.2 Lipids extraction 59
3.2.4.3 Carotenoids and chlorophylls analysis 59
3.2.4.4 Total lipids extraction and analysis 61
3.2.4.5 Determination of chlorophyll 61
3.2.4.6 Immunoblot Analysis 62
3.2.4.7 Total protein extraction and analysis 63
3.2.4.8 Total carbohydrates extraction and analysis 64
3.2.4.9 Glycerolipids analysis and quantification 65
3.3 Result and analysis 65
3.3.1 Morphological changes during the encystment of *H. pluvialis* 65
3.3.2 Pigments profiling changes during the encystment 67
3.3.3 Changes of photosynthetic capacities during encystment and high light acclimation 68
3.3.4 Changes in biochemical composition during encystment and under high

light 71
3.3.5 Quantitative analysis of glycerolipids 73
3.3.6 Characterization of membrane glycerolipids and their remodeling during encystmentand high light acclimation 75
3.3.7 TAG species profiling 77
3.4 Discussion 80
3.4.1 Encystmentprocess involves development of multiple defense mechanisms 80
3.4.2 Glycerolipids biosynthesis in *H. pluvialis* 83
3.4.3 Remodeling of the chloroplast membrane glycerolipids under high light stress conditon 85
3.4.4 Implications in producing astaxanthin from palmella cells 87
Chapter 4 Crosstalk between astaxanthin and fatty acid biosynthesis pathways in *H. pluvialis* 88
4.1 Introduction 88
4.2 Material and methods 89
4.2.1 Algae strain 89
4.2.2 Main reagents and instruments 89
4.2.3 Algae culture 89
4.2.3.1 Media 89
4.2.3.2 Algae preservation and preculture 89
4.2.3.3 Algae culture 89
4.2.4 Analytical methods 89
4.2.4.1 Determination of cell number 89
4.2.4.2 Determination of dry weight of algae 90
4.2.4.3 Pigments extraction and analysis 90
4.2.4.4 Total lipid extraction and analysis 90
4.2.4.5 RNA isolation, generation of cDNA, and quantitative RT-PCR 90
4.2.4.6 Extraction of crude enzyme and separation of cell subfractions 90
4.2.4.6 Astaxanthin synthesis *in vitro* 91
4.2.4.7 Immunoblot analysis 92
4.3 Result and analysis 92
4.3.1 Cell growth, astaxanthin and fatty acids accumulated in *H. pluvialis* 92

4.3.1.1 Cell growth 92
4.3.1.2 Astaxanthin and fatty acids accumulated in *H. pluvialis* under various conditions 93
4.3.2 Confirmation of the crosstalk between fatty acid and astaxanthin biosynthesis in *H. pluvialis* 94
4.3.3 The coordination of fatty acid synthesis and carotenogenesis was studied at the transcript level 96
4.3.3.1 Genes expression level of astaxanthin biosynthesis under various conditions 96
4.3.3.2 Genes expression level of fatty acids biosynthesis under various conditions 99
4.3.4 Coordination of fatty acid and astaxanthin synthesis was studied at metabolite level 98
4.3.4.1 Restoration of astaxanthin synthesis by addition of exogenous fatty acids 98
4.3.4.2 Effect of exogenous fatty acids on astaxanthin accumulated in *H. pluvialis* 100
4.3.5 Effect of esterification for astaxanthin accululated in *H.pluvialis* 102
4.3.5.1 Development of methods for astaxanthin biosynthesis *in vitro* ... 102
4.3.5.2 Effect of fatty acids on astaxanthin biosynthesis *in vitro* 106
4.3.5 Localization for astaxanthin biosynthesized in *H. pluvialis* 108
4.3.7 Enzymes involved for catalyze astaxanthin esterification 110
4.4 Discussion 112
4.4.1 Astaxanthin esterification is an essential process for enormous astaxanthin accumulation in *H. pluvialis* 112
4.4.2 Synthesis of free astaxanthin and astaxanthin esters is associated with the ER 113
4.4.3 DGATs may be the candidate enzyme for the synthesis of astaxanthin esters 115
Chapter 5 Conclusions and Prospect 116
5.1 Conclusions 116
5.2 Problems and prospects 118
References 119

Appendix..... 136

Publications during graduate study 144

Acknowledgement 145

缩 略 词

AAPT: aminoalchoholphosphotransferase;

ABCAT: ABC acyl transporter;

ACBP: acyl-CoA binding protein;

ACC: acetyl-CoA carboxylase;

ACCase: acetyl-CoA carboxylase;

ACP: acyl carrier protein;

ARAT: acyl-CoA: retinol acyltransferase;

BC: biotin carboxylase;

BCCP: biotin carboxyl carrier protein;

BE-PSS: base-exchange-type phosphatydylserine synthase;

BKT: *β*-carotene ketolase;

CDP-DAGS: CDP-DAG synthase;

CCT: choline-phosphate cytidylyltransferase;

CK: choline kinase;

CrtR-b: *β*-carotene 3,3'-hydroxylase;

CT: carboxyltransferase;

CHYB: carotene β-hydroxylase;

CHYE: carotene ε-hydroxylase;

DAG: diacylglycerol;

DAGTA: diacylglycerol transacylase;

DAG-CPT: CDP-choline:diacylglycerol cholinephosphotransferase;

DAG-EPT: CDP-ethanolamine:diacylglycerol cholinephosphotransferase;

DGAT: diacylglycerol acyltransferase;

DGDG: digalactosyldiacylglycerol;

DGTA: 1(3),2-diacylglycerol-(3)-O- hydroxymethyl (N,N,N-trimethyl)-*β*-alanine;

DGTS: 1(3),2-diacylgly- ceryl-(3)-O-4'-(N,N,N-trimethyl)-homoserine

ER: endoplasmic reticulum;